



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 39/44, 47/48, A61P 35/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/54807</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月21日(21.09.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01563</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月15日(15.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/71690 1999年3月17日(17.03.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)[JP/JP] 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 田川俊明(TAGAWA, Toshiaki)[JP/JP] 平川容子(HIRAKAWA, Youko)[JP/JP] 細川斉子(HOSOKAWA, Saiko)[JP/JP] 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱東京製薬株式会社 横浜研究所内 Kanagawa, (JP) 鈴木 勉(SUZUKI, Tsutomu)[JP/JP] 〒194-0042 東京都町田市東玉川学園一丁目12-28 Tokyo, (JP) 矢田信久(YADA, Nobuhisa)[JP/JP] 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 シーエーシーズ株式会社 横浜分析センター内 Kanagawa, (JP)</p>		<p>長池一博(NAGAIKE, Kazuhiro)[JP/JP] 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社 横浜総合研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 松山直行, 外(MATSUYAMA, Naoyuki et al.) 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱東京製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: LIGAND-BONDED COMPLEX</p> <p>(54)発明の名称 リガンド結合複合体</p> <p>(57) Abstract A ligand-bonded complex which can react not with free targets such as a soluble tumor antigen but substantially specifically with an unliberated target such as a tumor cell or a tumor antigen occurring in the cell.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

可溶性腫瘍抗原などの遊離標的物には反応せず、腫瘍細胞や該細胞に存在する腫瘍抗原などの非遊離標的物に対して実質的に特異的に反応できるリガンド結合複合体。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LV ラトヴィア	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MG マダガスカル	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	VN ヴェトナム
CN 中国	IS アイスランド	MZ モザンビーク	YU ユーゴスラヴィア
CU コスタ・リカ	IT イタリア	NE ニジェール	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NO ノールウェー	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	NZ ニュー・ジーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PL ポーランド	
DK デンマーク	KR 韓国	PT ポルトガル	
		RO ルーマニア	

## 明細書

## リガンド結合複合体

## 5 技術分野

本発明はリガンド結合複合体に関する。より具体的には、本発明は、遊離抗原などの遊離標的物とは実質的に結合せず、癌細胞等の標的物に対して特異的に反応するリガンド結合複合体に関するものである。

## 10

## 背景技術

抗体等の反応特異性のあるリガンドを用いて細胞特異的、部位特異的に薬物を誘導する試みが広く行われている。癌細胞に対するターゲティング療法はこの一例である。すでに、抗体と毒素及び抗体とや放射性化合物との複合体ならびにイムノリボソーム等の医薬がすでに開発されており、また抗体と放射性化合物との複合体を用いた癌等の体内診断も行われている。このような抗体結合複合体を用いたターゲティング療法は、  
20 標的物に対するリガンド（抗体など）の高い特異性に基づいており、優れた治療効果と副作用の低減が期待できる。

一方、ターゲティング療法では、血中等に存在する遊離抗原などの遊離標的物に対して抗体結合複合体が  
25 反応してしまい、原発巣や転移巣などの非遊離抗原などを有する固形腫瘍組織に対して十分量の薬物が反応できないという問題点が指摘されている。つまり、ある種の癌で見られるように、抗原の一部が血中に分泌

したり、あるいは癌細胞から抗原が逸脱することによって遊離の抗原（可溶性抗原）が血中に出現すると、その遊離抗原に対して抗体結合複合体が反応して免疫複合体が形成され、標的細胞への反応が阻害されてしまうという問題である。このため、抗体結合複合体をデザインする場合には、通常、血中の遊離抗原がないか、または遊離抗原が極めて少ない抗体を選択する必要がある。さらに、臨床で血清診断による意義が認められている抗原に対する抗体を抗体結合複合体の製造に用いることは困難であった。

#### 発明の開示

本発明者らは上記の課題を解決すべく、遊離抗原のような可溶性標的物と抗体などのリガンドとの関係を研究した結果、驚くべきことに、標的物に対するアフィニティーの低いリガンドを複数個結合させたリガンド結合複合体が、遊離標的物の存在下においても癌細胞などの非遊離の標的物に対して高い反応性を有することを見いだした。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明によれば、遊離抗原などの遊離標的物とは実質的に結合せず、癌細胞等の非遊離の標的物に対して特異的に反応しうるリガンド結合複合体が提供される。より詳細には、本発明は、標的物に対してアフィニティーを有するリガンドを微粒子に対して直接又は間接的に結合させたリガンド結合複合体であって、該リガンドのアフィニティーが、遊離標的物の存在下においても該リガンド結合複合体が非遊離標的物に対

して実質的に特異的に結合することができるようなア  
フィニティーであることを特徴とするリガンド結合複  
合体：実質的に同一のアフィニティーを有する1種類  
のリガンドを1個の微粒子に対して2個以上結合させ  
5 た上記複合体：該リガンドが非遊離標的物に反応する  
のに十分な量である上記複合体が提供される。

また、リガンドが微粒子に対して直接結合した上記  
複合体：水溶性高分子が微粒子に結合した上記複合  
体：リガンドの一部又は全部が微粒子に対して間接的  
10 に結合した上記複合体、好ましくはリガンドの一部又  
は全部が微粒子に対して水溶性高分子を介して間接的  
に結合した上記複合体が提供される。

また、上記水溶性高分子がポリアルキレングリコー  
ール、好ましくはポリエチレングリコールである上記  
15 複合体：微粒子が低分子薬剤、マーカ分子、タンパ  
ク質、ミセル、及びリポソームからなる群から選ばれ  
る上記複合体：微粒子がリポソームである上記複合  
体：医薬の有効成分を封入したリポソームである上記  
複合体：医薬が抗腫瘍剤である上記複合体：好ましく  
20 はアドリアマイシンなどの抗腫瘍剤等を封入したリポ  
ソームである上記複合体：リガンドが抗体、好ましく  
は抗腫瘍抗体、より好ましくはヒト癌細胞反応性ヒト  
モノクローナル抗体である上記複合体が提供される。

また、標的物と1個のリガンドとの解離定数が $E-8$   
25  $M$ 以上、より好ましくは $E-7$   $M$ 以上である上複合  
体：上記複合体を含有する医薬組成物が提供される。

本発明のさらに好ましい態様のリガンド結合複合体  
では、微粒子がアドリアマイシンを封入したリポソー

ムであり、リボソームの表面にポリエチレングリコールが結合されており、かつ該ポリエチレングリコールの一部に上記アフィニティーを有する抗腫瘍抗体、好ましくはヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体が結合している。該抗腫瘍抗体はリボソーム 1 個あたり 2 個以上（複数個）、すなわち非遊離標的物に反応するのに十分な量結合しており、ポリエチレングリコールの先端部分に結合していることが好ましい。

#### 10 図面の簡単な説明

第 1 図は、1-3-1 抗体及び poly 1-3-1 抗体を用いたエンザイムイムノアッセイの結果を示す。図中、横軸は抗体濃度、縦軸は O P D を基質として用いた吸光度を示し、1-a は抗原を固定化した場合の結果を示し、1-b は抗体を固定化した場合の結果を示す。

第 2 図は、蛍光色素を封入した各種リガンド結合リボソームを遊離抗原の存在下で標的細胞に反応させた結果を示した図である。図中、横軸は反応液中の可溶性抗原（遊離抗原）濃度を示し、縦軸はリボソームの細胞への結合量を示す。可溶性抗原が共存しないときの細胞へのリボソームの結合量を 100 として示した。

第 3 図は、アドリアマイシン（D X R）を封入した 1-3-1 抗体結合イムノリボソームのヒト大腸癌細胞株 D L D-1 に対するインビトロ抗腫瘍効果を示した図である。図中、横軸はリボソーム量を D X R 量として示してあり、縦軸はリボソーム非添加時の細胞数を 100 とした各リボソーム濃度での細胞数の割合を

示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のリガンドとしては、標的物に対して適度な  
5 アフィニティーを有するものであれば、その種類は特  
に限定されないが、例えば、トランスフェリン、CE  
A、EGF、AFP等の蛋白質；インシュリン等のペ  
プチド；モノクローナル抗体等の抗体；腫瘍抗原など  
10 の抗原；ホルモン；伝達物質；ルイスX、ガングリオ  
シド等の糖質；葉酸やその誘導体のような低分子化合  
物を用いることができる。上記に例示したリガンドは  
その全体を用いてもよいが、酵素処理等によって得ら  
れるそのフラグメントを用いてもよい。また、人工的  
15 に合成されたペプチドやペプチド誘導体であってもよ  
い。抗体を治療用に用いる場合は、マウスーヒトのキ  
メラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体などが好ましい。  
リガンドとしては抗体が好ましく、抗腫瘍抗体がより  
好ましい。特に好ましいのは、ヒト癌細胞反応性ヒト  
モノクローナル抗体、さらにはヒト癌細胞反応性ヒト  
20 モノクローナル抗体 1-3-1（特開平5-3049  
87号参照）である。

本明細書において「標的物」とは、リガンドが特異  
的に結合できる物質を意味しており、その種類は特に  
限定されず、低分子物質又は高分子物質のいずれでも  
25 よい。標的物としては、例えば、抗原、抗体、レセプ  
ター、増殖因子などを挙げることができる。リガンド  
と標的物とは、通常は別の分子を意味しているが、同  
一分子同士で結合する性質を有する高分子物質、例え

ば胎児性癌抗原であるCEA（CEA同士での弱い相互作用により細胞接着に寄与していると考えられている）をリガンド及び標的物として用いてもよい。標的物としては、腫瘍抗原が好ましく、特に好ましいのは

5 ヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体1-3-1により認識可能な大腸癌・胃癌等の腫瘍抗原等が挙げられる。

本明細書において「非遊離標的物」という場合には、リガンドが結合する標的物を有する細胞や組織などを

10 包含する概念として用いる。

本明細書において「遊離標的物」とは、一般的には腫瘍細胞や腫瘍組織などの固形状態で存在している非遊離の標的物から血液中又はリンパ液中などに放出される低分子化合物、ポリペプチド、又は蛋白質などの

15 物質であって、一般的には該リガンドが非遊離の標的物と実質的に等価に認識可能なものを意味している。典型的な遊離標的物は、腫瘍細胞から血中に放出される可溶性抗原である。遊離標的物は、非遊離の標的物に存在する細胞表面抗原と同一物質であってもよく、

20 同一エピトープを有する類似の分子種であってもよい。つまり本発明におけるリガンドは微粒子上に複数個結合しているため、みかけ上のアフィニティーが高くなるため、「非遊離標的物」とは特異的に結合し、「遊離標的物」とは実質的には特異的に結合しないのであ

25 る。

本発明のリガンド結合複合体に用いられるリガンドは、遊離標的物の存在下において、リガンド結合複合体が非遊離標的物に対して実質的に特異的に結合する



ことができるような標的物に対するアフィニティーを有している必要がある。リガンドが上記のアフィニティーを有するか否かは、リガンド結合複合体を製造した後、本明細書の実施例に具体的に説明した方法に従って、遊離標的物の存在下で非遊離標的物に対する結合能を調べることにより、容易に判定することが可能である。

リガンドのアフィニティーの程度をコントロールするためには、リガンドを化学修飾して構造の一部を改変してもよく、抗体、蛋白質、ペプチドなどの場合にはアミノ酸変異を遺伝子工学的に導入してもよい。単鎖抗体のような改変体を用いることもできる。例えば、リガンドと標的物との解離定数が  $E-8$  (M) 程度より大きいもの、好ましくは  $E-7$  (M) 程度より大きいものが好適である。

微粒子に複数個のリガンドを結合する方法として、リガンド同士を架橋させる方法を採用してもよい。架橋は架橋試薬を用いた一般的な方法により達成できる。例えば、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、又はピリジル・ジスルフィド法などの架橋方法を採用することができる（酵素免疫測定法、石川栄治ら、医学書院）。架橋した抗体などのリガンドに対して、毒素、蛋白質、薬剤、放射性元素等を結合させることもできる。例えば、クロラミンT法を用いて放射性ヨウ素を抗体に導入することができる。また、アミノベンジル-EDTAやイソチオシアノベンジル-EDTA等の2価性キレート試薬を用いて  $^{125}\text{I}$  等を導入することもできる（核医学、31、473（1994））。

リポソームの表面に水溶性高分子を結合させることにより、リポソームの特性を改変できることが知られている。このような水溶性高分子を本発明のリガンド結合複合体の微粒子表面に結合することができる。水溶性高分子は、所望の特性に応じて適宜の水溶性高分子を選択することができるが、例えば、ポリアルキレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリグリセリン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリアミノ酸等の合成高分子などを用いることができる。また、ポリアミノ酸、ポリオキシ酸等の生分解性ポリマーも好適に使用される。水溶性高分子の分子量は約500～20,000が好ましく、1,500～10,000がより好ましく、さらに好ましくは2,000～6,000である。水溶性高分子として、好ましくはポリアルキレングリコール、より好ましくはポリエチレングリコールを用いることができる。

水溶性高分子を微粒子表面に結合する場合には、水溶性高分子の一部又は全部に対してリガンドの一部又は全部を結合させることができる。例えば、微粒子表面に結合されたポリアルキレングリコールのうちの一部にリガンドの全てを結合させる態様は、本発明の好ましい態様である。この場合、ポリアルキレングリコールの先端にリガンドを結合させることがより好ましい。また、例えば、ポリリジン、ポリアスパラギン酸等のポリアミノ酸にアミド結合を介してリガンドを導入することが可能である。そのリガンドに対して、さらに放射性同位体、毒素蛋白質、薬剤等を導入してもよい。

本発明のリガンド結合複合体を構成する微粒子としては、例えば、分子中に親水性部分及び疎水性部分を含む両親媒性分子の凝集によって得られるミセル、高分子ミセル、マイクロスフェア、エマルジョン、リボソーム、リボソームなどの二分子膜小胞体を重合して得られる高分子ベシクル、カチオニックリボソーム、遺伝子複合体などを用いることができる。微粒子は両親媒性物質から構成される小球、楕円体、又は長い円筒形の形態を取りうるが、例えば、細胞、ウイルス等の天然小胞、天然小胞を放射線照射や高分子で修飾した改変天然小胞、リボソーム、*novosome*、非界面活性剤ベシクルなどであってもよい。微粒子の粒径は、例えば20～500nm程度である。

微粒子として、好適にはリボソームを用いることができる。リボソームの種類は特に限定されず、マルチラメラリボソーム(MLV)、スモールユニラメラリボソーム(SUV)、ラージユニラメラリボソーム(LUV)のいずれでもよいが、好ましくはLUVを用いることができる。

微粒子を構成する両親媒性分子としては、親水性部分及び疎水性部分を含み、微粒子を形成できるものであればその種類は限定されない。例えば、好適な両親媒性物質としては脂質を挙げることができる。脂質としては、例えば、天然フォスファチジルコリン、例えば卵黄フォスファチジルコリン(EYPC)等；フォスファチジルコリン(PC)、例えばジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)、ジミリストイルフォスファチジルコリン(DMPC)、ジステアロ

イルフォスファチジルコリン (D S P C)、ジオレオ  
イルフォスファチジルコリン (D O P C) 等；天然フ  
ォスファチジルエタノールアミン、例えば卵黄フォス  
ファチジルエタノールアミン (E Y P C)；フォスフ  
5 アチジルエタノールアミン (P E)、例えばジパルミ  
トイルフォスファチジルエタノールアミン (D P P E)、  
ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン (D  
O P E)、ジミリストイルフォスファチジルエタノー  
ルアミン (D M P E) 等；フォスファチジルグリセロ  
10ール (P G)、例えばジパルミトイルフォスファチジ  
ルグリセロール (D P P G) 等；フォスファチジルセ  
リン (P S)；フォスファチジルイノシトール (P I)；  
フォスファチジン酸 (P A)、例えばジパルミトイル  
フォスファチジン酸 (D P P A) 等のリン脂質、スフ  
15 インゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等を挙げることができ  
る。これらの脂質は単独または2種以上、あるいはこ  
れらとコレステロール等の非極性物質とを組み合わせ  
てもよい。さらに、ステアリルアミン、ジセチルフオ  
スフェート、D C - C h o l (3  $\beta$  -[N-(N', N'-dimet  
20 hyl(aminoethyl)carbamoyl)cholesterol]等のコレス  
テロール誘導体などの荷電性物質、マレイミド基を有  
するリン脂質誘導体(特開平6-157559号公報)  
やPEG先端にマレイミド基を有するリン脂質誘導体  
(特開平6-220070号公報)等を含んでいても  
25 よい。また、融合リボソームとして知られるリボソーム  
とセンダイウイルスを融合したリボソームのように、  
ウイルスの一部又は全部を組み込んだものであっても  
よい。

ミセル又はリボソームなどの微粒子の製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも採用することができる。例えば、ガラス壁に付着させた脂質薄膜に水溶液を加え機械的震とうを加えMLVを製造する方法；超音波処理、エタノール注入法、フレンチプレス法によりSVを製造する方法；界面活性剤除去法、逆相蒸発法（リボソーム、砂本ら、南江堂、1988）、MLVを均一ポア径を有するメンブランを加圧して押し出すエクストルージョン法等によりLUVを製造する方法などを利用することができる（Liposome Technology, Vol. 1, 2nd edition）。

微粒子内に封入する医薬の種類は特に限定されず、治療、予防、又は診断に用いられる医薬の有効成分を微粒子内に封入することができる。例えば、アドリアマイシン（ドキソルビシン：DXR）、ダウノマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、マイトマイシン、ブレオオマイシン、5-FU等の抗腫瘍剤；チモロール等のアドレナリン遮断薬；クロニジン等の高血圧剤；プロカインアミド等の制吐剤；クロロキニーネ等の抗マラリア剤；アンフォテニンシン等の抗生物質；リシンA鎖やジブテリアトキシン等の毒素蛋白質及びそれをコードする遺伝子；k-ras等のアンチセンス遺伝子、TNFやP53等をコードする遺伝子、これらの遺伝子とポリリジン等のポリカチオンとの複合体；ヨード、レニウム、インジウム、テクネチウム、イットリウム等の放射性同位元素；ガドリニウム等のMRI造影剤；ヨウ素化合物などのX線造影剤；CO<sub>2</sub>等の超音波造影剤；ユーロピウム、カル

ボキシフルオレッセイン等の蛍光体；N-メチルアクリジウム誘導体等の発光体；ホースファディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素などを挙げることができる。

- 5      これらの医薬の微粒子内への封入方法は特に限定されず、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。例えば、微粒子としてリボソームを用いる場合には、リボソーム形成時に有効成分の水溶液を添加して封入することができ、またリボソーム
- 10   形成後にベシクル内外にpH勾配等の濃度勾配を形成させ、このポテンシャルを駆動力としてイオン化可能な薬剤を取り込ませる方法（Cancer Res. 49, 5922(1989)；BBA, 455, 269(1976)）を用いても良い。

- リガンドを微粒子に結合する手段は特に限定されず、
- 15   共有結合、イオン結合などのいかなる手段で結合してもよい。例えば、微粒子としてリボソームを用いる場合は、リボソームにリガンドと反応しうるマレイミド基やカルボキシル基等の反応基を導入し、リボソーム形成後にリガンドを結合することができる（特開平6
- 20   ー157559号公報、特開平6ー220070号公報、Advanced Drug Delivery Reviews, 24, 235(1997)）。より具体的には、マレイミドカプロイルジパルミチルフォスファチジルエタノールアミン（特開平4
- 25   ー346918号公報）やマレイミドフェニルブチロイルフォスファチジルエタノールアミンなどのマレイミド基部分を有する脂質をフォスファチジルコリンやコレステロールとともに公知の方法に従ってリボソーム化することにより、マレイミド基部分を有するリボ

ソームを製造することができる（リボソーム、2章、野島ら編、南江堂（1988））。

また、リガンドに脂質等の疎水性化合物を導入しておき、界面活性剤除去法でリボソーム形成時にリガンドをリボソームに導入することができる（BBA, 1070, 246(1991)）。リガンドは微粒子に直接結合していてもよいが、上記のように、水溶性高分子をスペーサーとして間接的に微粒子に結合していてもよい。スペーサーとして利用可能な水溶性高分子として、例えば、特願平10-263262号明細書に開示された水溶性高分子誘導体を用いることができる。リガンドを微粒子に結合した後、さらに必要に応じて微粒子の表面を水溶性高分子で修飾することも可能である。

本発明のリガンド結合複合体は、微粒子内部に封入された医薬の種類に応じて、目的とする疾患の治療、予防、又は診断に用いることができる。投与方法、投与量は封入された医薬の種類、微粒子の性質、及び投与目的に応じて適宜選択することができるが、一般的には、血管内投与、膀胱内投与、腹腔内投与、局所投与法などの投与経路で用いることが望ましい。

本発明のリガンド結合複合体の特に好ましい態様では、微粒子としてアドリアマイシンを封入したリボソームを用い、リボソームの表面にポリエチレングリコールが結合されている。そのうちの一部のポリエチレングリコールには、先端部に抗腫瘍抗体が結合されており、リボソーム1個あたり複数個、すなわち非遊離標的物に反応するのに十分な量の抗体が結合している。すなわちこの抗体は、上記複合体が血中に存在する遊

離の腫瘍抗原に対しては実質的に反応せず、腫瘍抗原を有する非遊離の標的物（腫瘍細胞や腫瘍組織）に対して特異的に反応するようなアフィニティーを有している。

- 5 上記の好ましい態様のリガンド結合複合体は、腫瘍のターゲッティング療法に有用であり、血管内投与、膀胱内投与、腹腔内投与、又は局所投与により用いることができる。投与量は、アドリマイシンとして 10 m g / k g 以下、好ましくは 5 m g / k g 、より好ましくは 1 m g / k g 以下である。対象となる腫瘍は特に限定されないが、固形腫瘍、好ましくは胃癌、大腸癌、食道癌、口腔癌、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、肺癌、脳腫瘍などの固形癌などのうち、腫瘍抗原を利用可能な癌種を対象とすることが好ましい。
- 10 腫瘍抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体の製造方法は当業者に周知であり、本明細書において規定したアフィニティーを有するモノクローナル抗体を適宜選択することが可能である。
- 15

## 20 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

### 25 実施例 1 ①：1-3-1 抗体の解離定数

ヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体 1-3-1 ( I g G ) の F ( a b ' ) 2 フラグメント ( 分子量：100 K D a ) を用い抗体結合リボソームを作製した。



本抗体はヒトエノラーゼ ( $\alpha$  及び  $\gamma$ ) 及びヒト胃癌細胞 M K N 4 5 に反応性を有する。本抗体を F I T C ラベルし、パラホルムアルデヒドで固定した M K N 4 5 に対する解離定数をフローサイトメーター (F A C S v a n t a g e ベクトンデッキンソン社) を用い  
5 測定したところ  $1 \text{ E} - 7 \text{ (M)}$  であった。解離定数は、反応における結合反応及び解離反応を以下のように速度論的に解析して求めた。

結合反応：パラホルムアルデヒドで固定した M K N 4 5 細胞を  $500 \mu \text{L}$  の  $1\%$  B S A 溶液に懸濁し、終濃度が  $1 \sim 10 \mu \text{g} / \text{mL}$  になるように F I T C 標識抗体を正確にとりチューブにセットした。液温を  $25^\circ \text{C}$  にした後、サンプルポートに備わっている Vortex を用いて抗体と細胞を瞬時に混合すると同時に細胞を  
10 流して計測をスタートした。フローサイトメーターは細胞に結合した蛍光のみを検出することができるので、フリーの抗体存在下でも細胞に結合した抗体によるシフト量のみを測定できる。測定開始後、 $5 \text{ s}$  から  $10 \text{ s}$  間隔で抗体結合によるシフト量を測定し、既知の蛍  
15 光強度を持つ蛍光ラテックスビーズ (オーソダイアノスティックシステムズ) を用いた検量線から蛍光量値に変換した。蛍光量値はさらに抗体一分子に導入された蛍光分子数で除することで細胞に結合した抗体量に変換した。これにより各抗体初期濃度  $C$  条件で、測定  
20 時間  $t$  のときの細胞に結合した抗体量  $F t$  (すなわち抗原抗体コンプレックス量) が測定された。

抗体の抗原への結合反応速度定数  $k_{ass}$  は以下にして算出される。結合反応速度は抗原と抗体の濃度に比例

し、結合反応速度定数  $k_{ass}$  を用いて  $k_{ass} * C * (F_{max} - F_t)$  と現される。また、解離反応速度は同様に解離反応速度定数 ( $k_{diss}$ ) を用いて  $k_{diss} * F_t$  と現さる。抗原抗体コンプレックスに対して過剰量の初期抗体濃度を用いると、速度式、 $dF_t/dt = k_{ass} * C * (F_{max} - F_t) - k_{diss} * F_t$  が導かれる。さらに変形すれば  $dF_t/dt = k_{ass} * C * F_{max} - (k_{ass} * C + k_{diss})$  になる。各抗体濃度について時間 ( $t$ ) に対する  $F_t$  をプロットした曲線を回帰し、各時間に対する  $F$  値と導関数  $dF/dt$  をプロットすると一次関数になり、直線の傾きが  $-(k_{ass} * C + k_{diss})$  になるので、各濃度  $C$  における傾きを算出した。  $C$  と  $-(k_{ass} * C + k_{diss})$  の関係も一次式であり、プロットしてその直線の傾きから  $k_{ass}$  を算出した。

解離反応；細胞を各濃度の蛍光標識抗体と反応させた後、遠心分離により細胞を洗浄しフリーの抗体を除去した。遠心してペレットダウンした細胞にあらかじめ  $25^{\circ}\text{C}$  に保温した  $500\mu\text{L}$  の  $1\%$  BSA 溶液を加えて懸濁した後、すばやくフローサイトメータにより細胞に結合している蛍光量を測定した。上述のように各抗体濃度の各時間点での結合抗体量  $F_t$  を測定し、以下の方法で解離速度定数  $k_{diss}$  を算出した。抗体濃度  $C$  は  $0$  であるから、前述の式は  $dF_t/dt = -k_{diss} * F_t$  となる。この微分方程式を解く際に、決まった時間  $t_1$  から任意の時間  $t_n$  までの定積分を行うことで、 $\ln(F_{t1}/F_{tn}) = k_{diss} * (t_n - t_1)$  が得られる。したがって、 $t_n - t_1$  と  $\ln(F_{t1}/F_{tn})$  をプロットすることで、傾きから  $k_{diss}$  が得られた。以上の結果から解離定数  $K_d$  は  $K_d = k_{diss} / k_{ass}$  で算出した。

実施例 1 ②: 1 - 3 - 1 抗体の多量化及び非遊離抗原と  
遊離抗原に対する反応性

5 0 m M リン酸緩衝液、1 m M E D T A ( p H 7 .  
5 0 ) に溶解した上記 F ( a b ' ) 2 抗体 ( 1 . 3 m g / m  
l , 1 . 5 m l ) に、脱水メタノールに溶解した S -  
アセチルチオグリコール酸 N - ヒドロキシスクシンイ  
ミドエステル ( シグマ社 ) ( 以下「 S A T A 」と略す  
ことがある ) ( 5 m g / m l ) を 1 8  $\mu$  L 添加し 2 5  $^{\circ}$ C  
10 で 1 時間反応した。 P D - 1 0 ( ファルマシア社 ) で  
緩衝液を 5 0 m M リン酸緩衝液、1 m M E D T A ( p  
H 7 . 0 ) に交換した後、抗体溶液の 1 / 9 容量の 0 .  
5 M ヒドロキシルアミン溶液 [ 0 . 5 M ヒドロキシル  
アミン、0 . 5 M H E P E S 、 2 5 m M E D T A ( p  
15 H 7 . 0 ) ] を添加した。 2 5  $^{\circ}$ C で 1 0 分間反応し脱  
アセチルした後、0 . 1 M リン酸緩衝液 - 1 m M E D  
T A ( p H 6 . 0 ) で平衡化した P D - 1 0 で脱塩し、  
緩衝液交換してチオール基を導入した抗体を得た。

5 0 m M リン酸緩衝液、1 m M E D T A ( p H 7 . 0 )  
20 に溶解した上記 F ( a b ' ) 2 抗体 ( 1 . 3 m g / m l  
1 . 5 m l ) に、脱水メタノールに溶解した N - (  $\epsilon$  -  
マレイミドカプロイルオキシ ) スクシンイミド ( 同  
仁化学 ) ( 5 m g / m l ) を 1 8  $\mu$  L 添加し 2 5  $^{\circ}$ C で  
1 時間反応した。 P D - 1 0 で緩衝液を 5 0 m M リン  
25 酸緩衝液、1 m M E D T A ( p H 7 . 0 ) に交換した  
しマレイミド基を導入した 1 - 3 - 1 抗体を作製した。  
上記チオール基を導入した抗体とマレイミド基を導入  
した抗体を等量混合し 2 5  $^{\circ}$ C で 2 時間反応することで

多量体化した 1-3-1 抗体 (poly 1-3-1) を得た。この抗体の反応性を以下のエンザイムイムノアッセイ (EIA) 法で確認した。

非遊離抗原への反応性:  $\alpha$  エノラーゼを  $50 \mu\text{g} / \text{mL}$  の濃度で  $50 \text{ mM}$  炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解し、96 well プレートに加えて  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間反応することで固定化した。0.5%ゼラチンでブロッキング後、1-3-1 抗体、poly 1-3-1 抗体の希釈倍率を変えてプレートに添加した。 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応し、PBST (0.05% Tween 20 含有 PBS) でプレートを洗浄後、2 次抗体として抗ヒト IgG-HRP (免疫動物山羊、カペル社) を各 well に加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応した。PBST で洗浄後、OPD を基質としてプレートに固定化された  $\alpha$  エノラーゼに反応した抗体を検出した。なお、1-3-1 抗体と poly 1-3-1 抗体とでは、本 2 次抗体の反応性に違いはなかった。その結果、第 1 図-a に示すように poly 1-3-1 抗体で高い反応性が示された。

20 遊離抗原への反応性: poly 1-3-1 抗体及び 1-3-1 抗体の希釈濃度を変え、 $50 \text{ mM}$  炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解して 96 well プレートに加え、 $37^\circ\text{C}$  2 時間反応することで固定化した。0.5%ゼラチンでブロッキングした後、 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$  の  $\alpha$  エノラーゼを添加した。プレートを洗浄後、抗エノラーゼ抗体 (抗NSE抗体、Biomeda社、ウサギポリクロナール抗体) を 2 次抗体として用い、さらに抗ウサギ IgG-HRP 抗体を 3 次抗体として用いて、同

様に O P D で発色した。その結果、固定化した両抗体を用いた E I A では、溶液として添加したエノラーゼへの反応はほとんど認められなかった（第 1 図 - b）。

これらの結果は、固定化した  $\alpha$  エノラーゼに対して  
5 は、1 - 3 - 1 抗体に比べて p o l y 1 - 3 - 1 抗体のほうのはるかに高い反応性を有していること、並びに遊離抗原に対しては、1 - 3 - 1 抗体及び p o l y 1 - 3 - 1 抗体のいずれも実質的に反応性を有していないことを示している。従って、リガンド結合複合体  
10 の製造にあたり、リガンドとして 1 - 3 - 1 抗体のようなアフィニティーを有する抗体を微粒子に対して複数個結合させることにより、固定化抗原に対する反応性を高めるとともに、遊離抗原に対する反応性を低減できることが示唆された。なお、215 M 抗体 / 抗ウ  
15 サギ I g G - H R P 抗体の組み合わせで  $\alpha$  エノラーゼが検出可能であることは、上述のように直接エノラーゼをプレートに固定化して確認した（第 1 図 - b）。

なお、上記の試験に用いた  $\alpha$  エノラーゼは、ヒト胃癌細胞株 M K N 4 5 の培養上清から精製した。M K N  
20 4 5 を血清無添加で培養し、その培養上清 1 4 0 m L を限外濾過（P M - 1 0 アミコン社）で濃縮し、0 . 1 M 酢酸緩衝液（p H 5 . 0）に置換した。陽イオン交換クロマト M o n o - S（ファルマシア社）に負荷し同酢酸緩衝液で N a C l 濃度 0 M ~ 0 . 5 M のリニア  
25 グラジエントを行い溶出した。1 - 3 - 1 抗体に反応性のピークを集めて濃縮した後、Y M C - P A C C 4 - A P カラムにロードした。水（0 . 1 % T F A 含有）～アセトニトリル（0 . 0 8 % T F A 含有）

のリアグラジェントで展開し、1-3-1抗体に反応性の主ピークを分取した。本ピークはSDS-PAGEで単一バンドであり、ペプチドマップ、シーケンス解析の結果 $\alpha$ エノラーゼであることを確認した。

5

実施例2：1-3-1抗体結合リポソームの作製及び癌細胞への結合実験

「抗体へのチオール基の導入」

50 mMリン酸緩衝液、1 mM EDTA (pH 7.0) に溶解した上記F(ab')<sub>2</sub>抗体 (1.4 mg/mL) に、脱水したメタノールに溶解したSAT Aをモル比6.4倍添加して25℃で1時間反応した。0.1 M酢酸を添加しpHを4に調整した後、0.1 M酢酸緩衝液pH 4で平衡化したS-Pセファロース (ファルマシア社) にロードした。同緩衝液で洗浄した後、吸着した抗体を50 mMリン酸緩衝液、1 mM EDTA (pH 7.5) で溶出した。セントリコン30 (ミリポア社) で緩衝液を50 mMリン酸緩衝液、1 mM EDTA (pH 7.0) に交換した後、抗体溶液の1/9容量の0.5 Mヒドロキシルアミン溶液 (0.5 Mヒドロキシルアミン, 0.5 M HEPES, 25 mM EDTA (pH 7.0)) を添加した。25℃で10分間反応して脱アセチルした後、0.1 Mリン酸緩衝液-1 mM EDTA (pH 6.0) で平衡化したNAP-10 (ファルマシア社) で脱塩、緩衝液交換しチオール基を導入した抗体を得た。導入されたチオール基を4,4'-ジチオピリジン (シグマ社) を用いて定量した (続生化学実験講座5、p109、日本化学

会編)。生じる4-ピリドンの分子吸光係数を22,500、抗体1%溶液の280nmにおける吸収を14として計算したところF(ab')<sub>2</sub>あたりに導入されたチオール基は1.4であった。

#### 5 「リポソームの作製」

均一に混合したDPPC、コレステロール、ε-マレイミドカプロイルパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(MC-DPPE)(モル比:18/10/0.5)からなる脂質400mgに10mMカルボキシフルオレッセイン(CF)水溶液を4ml添加し、ボルテックスミキサーを用いて60℃で混合し水和した。さらに3回凍結融解を繰り返してCF封入マルチラメラリポソーム(MLV)を作製した。これを0.2μm及び0.1μmのニュクレオポアメンブランを装着したイクストルーダーに順次通すことで整粒し、CF封入リポソームを得た。

#### 「抗体のリポソームへの結合」

上記リポソームを0.1Mリン酸緩衝液1mMEDTA(pH6.0)で希釈し、脂質濃度として43mg/mLとした。このリポソーム溶液に脂質重量比8%の上記チオール化抗体を加え25℃で1時間反応させた後、さらに10℃で一夜反応した。この反応物を生理食塩水で平衡化したセファロースCL6Bで精製し、目的とする1-3-1抗体結合イムノリポソームを得た。得られたイムノリポソームの脂質濃度をリン脂質Cテストワコー(和光純薬社)で測定した。抗体量はSDSで可溶化後、BCAキット(ピアス社)を用いて定量した。その結果、抗体結合量は脂質の5

重量%であった。

「癌細胞への結合実験」

- ヒト胃癌細胞株 M K N 4 5 をヌードマウス皮下に移植し十分大きくなった時点で切除した。腫瘍組織を細切
- 5 後、メッシュで濾過して癌細胞を取り、パラフォルムアルデヒドで固定した。1-3-1 抗体結合イムノリポソーム及び各濃度のヒトニューロンスペシフィックエノラーゼ (γエノラーゼ Advanced ImmunoChemical 社) をヒト血清中で混合し (イムノリポソーム脂質濃
- 10 度 100 μg/mL)、37℃で30分ブレインキュベートした。ペレットダウンした上記癌細胞 (E6個) に本溶液を添加し、サスペンドして37℃で1時間反応した。癌細胞を1% BSA 含有 PBS で洗浄後、細胞に結合したイムノリポソームの蛍光をフローサイト
- 15 メーターで定量した。その結果、第2図に示すように遊離抗原 (可溶性抗原) の濃度を増加しても、細胞に対しての反応性はほとんど低下しなかった。

- 比較例 1 : V C A M - 1 抗体結合リポソームの作製及び癌細胞への結合実験
- 20

- 市販の抗ヒト V C A M - 1 マウスモノクローナル抗体 B B I G - V 1 (IgG、R & D systems 社) を用いる以外は実施例 2 と同様にして C F 封入抗 V C A M - 1 イムノリポソームを作製した。なお本抗体の解離
- 25 定数は E - 9 M であり、抗体結合量は脂質の 1 重量%であった。C F 封入抗 V C A M - 1 イムノリポソームのターゲット細胞としてヒト V C A M - 1 を導入した下記 C H O 細胞を、遊離抗原としてヒト V C A M - 1



gを用いること以外は実施例2と同様にして、遊離抗原のイムノリボソームの反応に及ぼす影響を調べた。その結果、第2図に示すように遊離抗原濃度に依存してイムノリボソームの反応性は急速に低下した。この比較例におけるターゲット細胞と遊離抗原は、以下のよう

5 比較例におけるターゲット細胞と遊離抗原は、以下のようにして調製した。

「ターゲット細胞」

ヒトVCAM-1 cDNA (R & D system社) を発現ベクターpME18sにサブクロニングし、耐性

10 性マーカーpSV2neoと共にCHOにリポフェクチを用いてコトランスフェクトすることによりG418耐性株をクローニングしてターゲット細胞とした。VCAM-1のCHO細胞膜上での発現はフローサイトメトリーで確認した。

15 「遊離抗原」

ヒトVCAM-1 cDNA (R & D system社) の細胞外領域 (1 ~ 698 アミノ酸) とヒトIgG1 H鎖のCH2 ~ CH3領域とをPCR法を用いて連結してcDNA (VCAM-1 Ig) を得た。このc

20 DNAを上述の方法でCHOに導入し、VCAM-1 Ig分泌CHO細胞を作製して、細胞培養液から分離精製した分泌型ICAM-1を遊離抗原として使用した。

25 実施例3 : CEA結合リボソームの作製及び癌細胞への結合実験

マーカーであるCEAは同時に接着因子としても作用し、CEA同士の弱い結合相互作用が知られている。

C E A を結合したリボソームに対する遊離抗原の影響を調べた。リボソームへの結合時の C E A の量を脂質比 1 % とすること以外は実施例 2 と同様にして、C E A を結合した C F 封入リボソームを作製した。リボソームに結合した C E A は脂質比 0 . 2 % であった。さらに、実施例 2 と同様にして、癌細胞への反応性をヒト胃癌細胞 M K N 4 5 及びフリーの C E A を用いて調べた。その結果、第 2 図に示すようにフリー C E A の存在下においても癌細胞に対する反応性はほとんど低下しなかった。

実施例 4 : D X R 封入 1 - 3 - 1 抗体結合リボソームの製造

塩化メチレン 1 0 m L に溶解したポリ (エチレングリコール) - ビス -  $\omega$  - アミノ -  $\alpha$  - カルボキシル (P E G 平均分子量 3 , 4 0 0 、 S h e a r w a t e r p o l y m e r s , I n c ) 1 g に S - アセチルチオグリコール酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル ( S i g m a ) 7 4 . 8 m g 及びトリエチルアミン 4 1  $\mu$  l を添加した。攪拌し溶解後、さらに 1 0 m g の S - アセチルチオグリコール酸 N - ヒドロキシスクシンイミドを添加し室温で 3 . 5 時間攪拌し反応した。反応進行は T L C (クロロホルム / メタノール = 8 5 / 1 0 、ヨースン発色、以下 T L C は同様の条件で行った) で添加したポリ (エチレングリコール) - ビス -  $\omega$  - アミノ -  $\alpha$  - カルボキシルの低 R f のスポットが高 R f (約 0 . 6) にシフトすることで確認した。

窒素下に溶媒を留去した反応物にクロロホルム 1 0

m L を添加し溶解した。クロロホルムで膨潤した s e p - p a k ( S I L I C A P L U S 、 W a t e s 社 ) に添加しクロロホルム / メタノール ( 4 / 1 ( v / v ) ) で溶出することでサンプルを前処理した。再び窒素下に溶媒を留去しクロロホルムに溶解後、シリカゲルカラム ( ローバーカラム、L i C h r o p r e p S i 6 0 、 2 5 × 3 1 0 c m 、 関東化学 ) に添加した。クロロホルムで洗浄後、クロロホルム / メタノール ( 8 5 / 1 5 ( V / V ) ) で展開溶離し T L C の R f が約 0 . 6 の主生成物をプールし精製した。窒素下に溶媒を留去し 5 8 3 m g を得た。5 4 3 m g を約 2 m L の脱水した塩化メチレンに溶解しジエチルエーテルを加え沈殿化し濾取し真空ポンプで減圧乾燥した。脱水した塩化メチレン 5 m L に溶解したのち、N - ヒドロキシスクシンイミド ( S i g m a ) 1 7 . 8 m g を加え 1 0 分間攪拌した。さらに N , N ' - ジシクロヘキシルカルボジイミド 3 1 . 9 m g を添加し窒素雰囲気下、攪拌しつつ室温で一夜反応した。沈殿物を濾別後、窒素下に溶媒を留去し少量の脱水塩化メチレンに溶解した。エチルエーテルを加え析出した沈殿を濾取し真空ポンプで減圧乾燥し T L C で単一な目的物 3 3 7 m g ( A c - S - P E G - S u c : 特願平 1 0 - 2 6 3 2 6 2 号明細書の実施例 1 に記載の化合物 ) を取得した。<sup>1</sup> H - N M R により目的物生成を確認した。

5 0 m M リン酸緩衝液、1 m M E D T A ( p H 7 . 0 ) に溶解した 1 - 3 - 1 抗体 ( F ( a b ' ) 2 ) ( 4 . 2 m g / m L ) に脱水メタノールに溶解した A c - S - P E G - S u c ( 6 0 m g / m l ) を添加した。抗

- 体に対し 8 倍モルの A c - S - P E G - S u c を加えて 2 5 ° C で 1 時 間 反 応 し た 。 本 P E G 誘 導 体 を 導 入 し た 1 - 3 - 1 抗 体 を 実 施 例 2 と 同 様 に し て S P - セ フ ア ロ ー ス で 精 製 し 、 ヒ ド ロ キ シ ル ア ミ ン で 脱 保 護 し て 、
- 5 P E G ス ペ ー サ ー を 介 し て チ オ ー ル 基 を 有 す る 抗 体 を 調 整 し た 。 P D - 1 0 で 脱 塩 し て 、 緩 衝 液 を 0 . 1 M リ ン 酸 緩 衝 液 、 1 m M E D T A ( p H 6 . 0 ) と し た 。 チ オ ー ル 基 の 導 入 量 を 同 様 に 測 定 し た と こ ろ 1 . 3 S H / 抗 体 で あ っ た 。
- 10 C F 溶 液 に 換 え て 0 . 3 M ク エ ン 酸 緩 衝 液 p H 4 . 0 を 用 い る こ と 以 外 は 実 施 例 2 と 同 様 に し て 、 0 . 1  $\mu$  m に 整 粒 し た リ ボ ソ ー ム を 作 製 し た 。 得 ら れ た リ ボ ソ ー ム を 1 M 水 酸 化 ナ ト リ ウ ム で 中 和 後 、 6 0 ° C に 加 温 し つ つ 脂 質 重 量 の 1 / 1 0 の ア ド リ ア マ イ シ ン ( 協
- 15 和 発 酵 ) を 添 加 し す る こ と で ほ ぼ 定 量 的 に ア ド リ ア マ イ シ ン を 封 入 し た 。 こ の ア ド リ ア マ イ シ ン 封 入 リ ボ ソ ー ム に 脂 質 の 8 重 量 % の 上 記 チ オ ー ル 化 抗 体 を 添 加 し て 2 5 ° C で 1 時 間 反 応 し た 。 さ ら に チ オ ー ル 化 ポ リ エ チ レ ン グ リ コ ー ル ( 特 開 平 4 - 3 4 6 9 1 8 号 公 報 )
- 20 を 反 応 さ せ 、 抗 体 及 び ポ リ エ チ レ ン グ リ コ ー ル を 結 合 し た イ ム ノ リ ボ ソ ー ム を 作 製 し た 。 さ ら に 対 照 と し て 、 チ オ ー ル 化 抗 体 を 結 合 さ せ る 以 外 は 上 記 と 同 様 に し て 、 抗 体 非 結 合 P E G 結 合 リ ボ ソ ー ム を 作 製 し た 。
- 25 1 - 3 - 1 抗 体 は ヒ ト 大 腸 癌 細 胞 株 D L D - 1 に 対 し て 反 応 性 を 有 し て い る 。 そ こ で 、 得 ら れ た ア ド リ ア マ イ シ ン を 封 入 し た 抗 体 結 合 及 び 抗 体 非 結 合 リ ボ ソ ー ム の 癌 細 胞 に 対 す る i n v i t r o 抗 腫 瘍 効 果 を 比 較 す る た め に D L D - 1 株 を 用 い た 。

D L D - 1 をヌードマウスの背部皮下に移植して形成した腫瘍から得られた細胞をマイクロチューブに分注し、抗体結合及び非結合リボソームを添加して 37℃で 1 時間反応した。リボソーム液を除去後、96  
5 穴プレートに播種して培養し、リボソーム無添加の細胞がほぼコンフルエントになった時点で M T T アッセイにより細胞数を計測した。その結果、第 3 図に示すように、抗体非結合リボソームに比べて抗体結合リボソームは高い増殖抑制効果を示した。

10

#### 産業上の利用可能性

本発明のリガンド結合複合体は、遊離抗原などの遊離標的物とは実質的に結合せず、癌細胞等の標的物に対して特異的に反応することができるので、例えば、  
15 腫瘍のターゲッティング療法を効率的に行うことができる。

## 請求の範囲

1. 標的物に対してアフィニティーを有するリガンドを微粒子に対して直接又は間接的に結合させたりガン
- 5 ド結合複合体であって、該リガンドのアフィニティーが、遊離標的物の存在下においても該リガンド結合複合体が非遊離標的物に対して実質的に特異的に結合することができるようなアフィニティーであることを特徴とするリガンド結合複合体。
- 10 2. 実質的に同一のアフィニティーを有する1種類のリガンドを1個の微粒子に対して2個以上結合させた請求項1に記載のリガンド結合複合体。
3. 上記リガンドが非遊離標的物に反応するのに十分な量である請求項2に記載のリガンド結合複合体。
- 15 4. リガンドが微粒子に対して直接結合した請求項1ないし3のいずれか1項に記載のリガンド結合複合体。
5. 水溶性高分子が微粒子に結合した請求項1ないし4のいずれか1項に記載のリガンド結合複合体。
6. リガンドの一部又は全部が微粒子に対して水溶性
- 20 高分子を介して間接的に結合した請求項1ないし5のいずれか1項に記載のリガンド結合複合体。
7. 水溶性高分子がポリアルキレングリコールである請求項5または6に記載のリガンド結合複合体。
8. 水溶性高分子がポリエチレングリコールである請
- 25 求項5または6に記載のリガンド結合複合体。
9. 微粒子が低分子薬剤、マーカ分子、タンパク質、ミセル、及びリポソームからなる群から選ばれる請求項1ないし8のいずれか1項に記載のリガンド結合複

合体。

10. 微粒子がリポソームである請求項9に記載のリガンド結合複合体。

5 11. リポソームが医薬の有効成分を封入したリポソームである請求項10に記載のリガンド結合複合体。

12. 医薬が抗腫瘍剤である請求項11に記載のリガンド結合複合体。

13. リガンドが抗体である請求項1ないし12のいずれか1項に記載のリガンド結合複合体。

10 14. 抗体が抗腫瘍抗体である請求項13に記載のリガンド結合複合体。

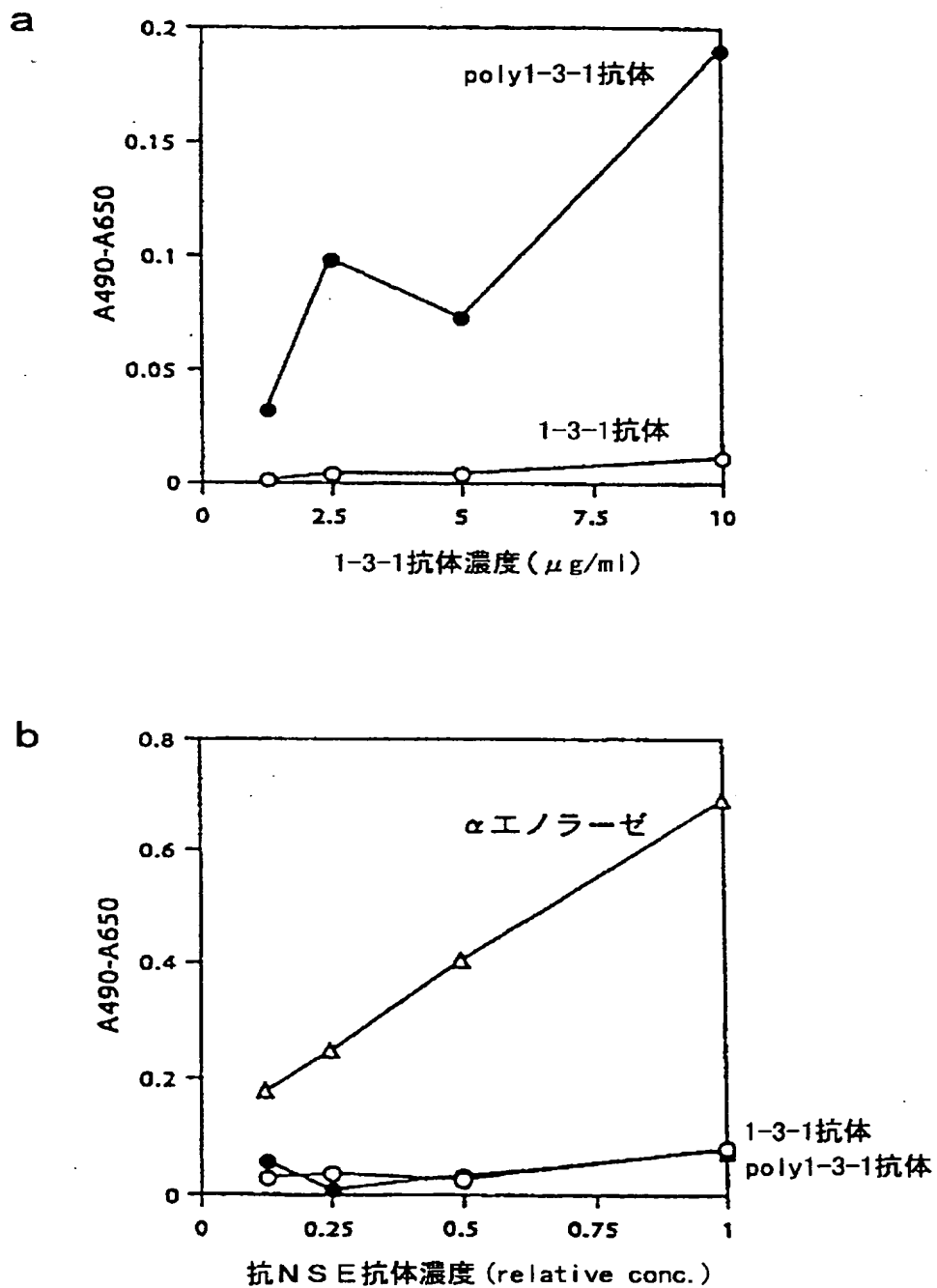
15. 抗体が水溶性高分子を介して抗腫瘍剤を封入したリポソームに結合した請求項14に記載のリガンド結合複合体。

15 16. 標的物と1個のリガンドとの解離定数が $E-8$ M以上である請求項1ないし15のいずれか1項に記載のリガンド結合複合体。

20 17. 標的物と1個のリガンドとの解離定数が $E-7$ M以上である請求項1ないし15のいずれか1項に記載のリガンド結合複合体。

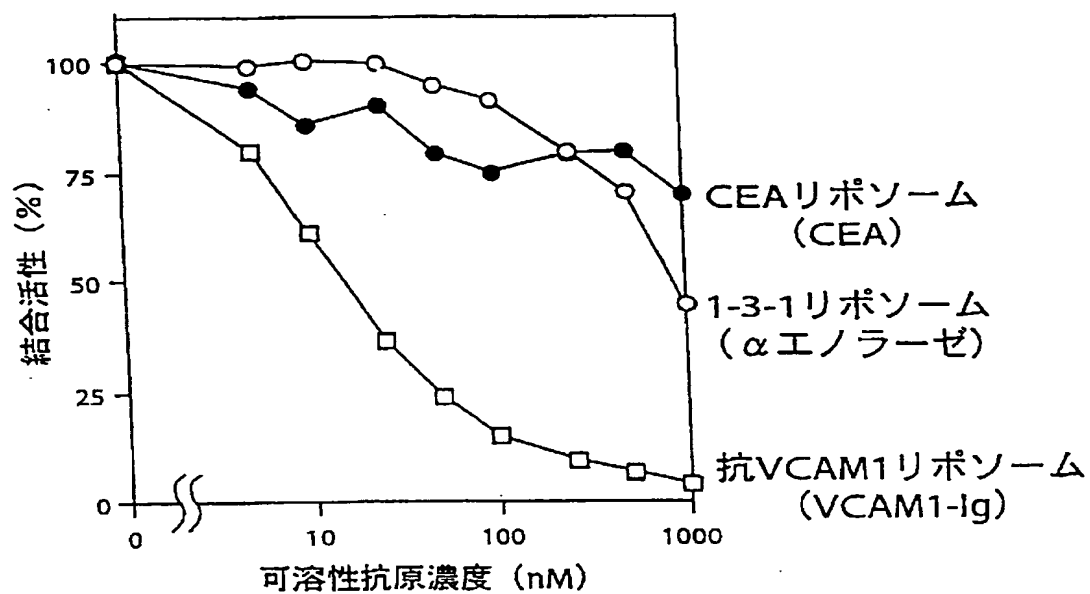
18. 請求項1～17のいずれかに記載の複合体を含有する医薬組成物。

第 1 図

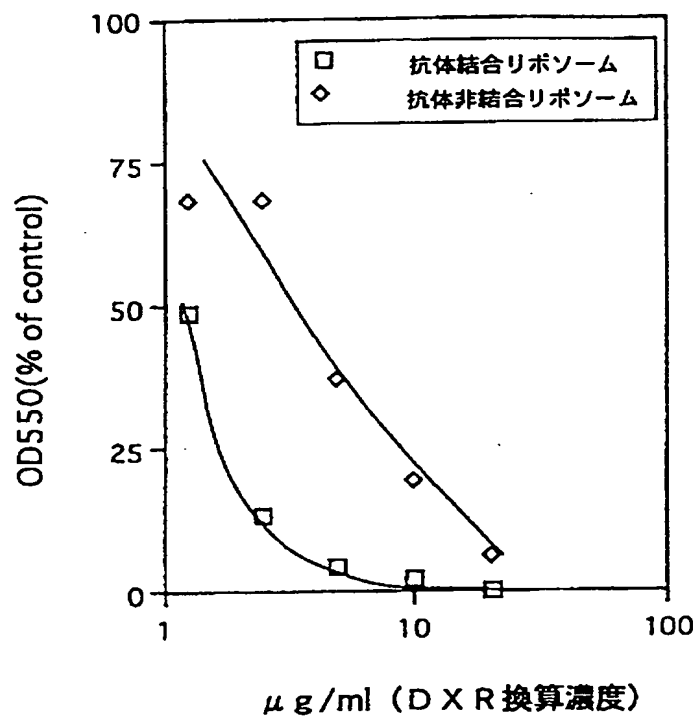




第 2 図



第 3 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01563

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K39/44, A61K47/48, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K39/44, A61K47/48, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 520499, A (Mitsubishi Kasei Corp.), 30 December, 1992 (30.12.92) & JP, 5-304987, A	1-18
A	JP, 9-110722, A (Toray Industries, Inc.), 28 April, 1997 (28.04.97) (Family: none)	1-18
A	CANCER LETTERS, 118, (2), 153-60 (1997)	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 June, 2000 (07.06.00)

Date of mailing of the international search report  
20 June, 2000 (20.06.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01563

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 1-18  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
In claim 1, the affinity of the "ligand" with a "target" is restricted by the function of "affinity allowing the substantially specific binding of the ligand-bonded complex to a free target even in the presence of the free target". However, it is unknown what "ligand" satisfies the above requirement to a "target". Thus, the International Search has been practiced on the scope of Examples.
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K39/44, A61K47/48, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K39/44, A61K47/48, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 520499, A (Mitsubishi Kasei Corp.) 30. 12月. 1992 (30. 12. 92) & JP, 5-304987, A	1-18
A	JP, 9-110722, A (東レ株式会社) 28. 4月. 1997 (28. 04. 97) (ファミリーなし)	1-18
A	CANCER LETTERS, 118, (2), 153-60 (1997)	1-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 06. 00

国際調査報告の発送日

20.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横尾 俊一

4P

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 6602

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-18 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲1は、「標的物」に対する「リガンド」のアフィニティーを「遊離標的物の存在下においても該リガンド結合複合体が遊離標的物に対して実質的に特異的に結合することができるようなアフィニティー」、と機能により限定している。しかし、「標的物」に対して、いかなる「リガンド」が上記要件を満たすか不明である。したがって、実施例の範囲について国際調査を行った。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**